



New MT-ND6 and NDUFA1 mutations in mitochondrial respiratory chain disorders

Uehara, Natsumi

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2014-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6242号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006242>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

New MT-ND6 and NDUFA1 mutations in mitochondrial respiratory chain disorders

ミトコンドリア呼吸鎖異常症における新規 MT-ND6 および NDUFA1 遺伝子変異

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

耳鼻咽喉頭頸部外科学

(指導教員：丹生 健一教授)

上原 奈津美

【目的】

ミトコンドリア呼吸鎖異常症 (MRCD) は、いかなる症状、臓器・組織、何歳でもどんな遺伝形式でも起こりうる。特に小児では臨床症状は非特異的で診断が困難である。原因はミトコンドリア DNA (mtDNA) と核 DNA の異常の両方ある。しかし同定されている原因遺伝子変異は少ない。我々は MRCD の新規原因遺伝子変異の同定を目的に本研究を行った。

【方法】

今回我々は、臨床症状および皮膚線維芽細胞もしくは罹患臓器を用いた BN-PAGE (blue native polyacrylamide gel electrophoresis) や呼吸鎖酵素活性の結果、複合体活性の低下で診断した小児 MRCD90 例を対象とした。インフォームド Consent のもと採取した患者由来の組織から DNA を抽出し、mtDNA の全周シーケンスを以下の方法で行い変異解析した。mtDNA には核に pseudogene があることが知られており、mtDNA(全周 16,569bp)を 6.5kb, 11.2kb の fragment として 1st-PCR を行い、その産物を鋳型として 2nd-PCR を行い、直接シーケンスを行った。ただし 7 例については、Ion PGM-TM sequencer を用いて mtDNA の全周シーケンス解析を行った。新規の mtDNA 変異が病因か鑑別するために、2 例で Cybrid Study を用いた。その結果 2 例中 1 例は mtDNA 変異が病因ではなかったため、エクソーム全周解析を行った。

【結果】

mtDNA 全周シーケンス解析の結果、多型のみが 61 例、多型以外の変異を認めた症例が 29 例だった。このうち、既知病因変異は 13 例、新規変異は欠失 3 例と点変異が 13 例だった。欠失 3 例は 1st-PCR の電気泳動結果、線維芽細胞および肝臓由来の DNA で、それぞれ Control と比べてかなり小さいサイズの band を認めた。これらの症例に対し直接シーケンス解析で欠失部位の確認を行った。欠失範囲はそれぞれ、3424 bp (nt12493-15916)、6639 bp (nt7734-14372)、5424 bp (nt8574-13997) と同定できた。臨床像は、肝臓障害の強い肝症 1 例、致死的乳児ミトコンドリア病 1 例、欠失症例が多く報告されている Pearson 症候群の 1 例であった。

同定した新規点変異を認めた 13 例のうち 2 例について cybrid study を行い、病因が mtDNA か核 DNA かを鑑別した。残りの 11 例は、核 DNA が病因と考えられる ComplexII 欠損症 1 例、酵素活性の低下部位と変異位置が異なり病因か判定が困難な 5 例、Cybrid study で検証困難な線維芽細胞で酵素活性の低下がみられない、もしくは変異率が低い 4 例であり cybrid study から除いた。Cybrid study を行った 2 例は、m.14439G>A (MT-ND6) と m.1356A>G (mitochondrial 12S rRNA) の変異をもつどちらも ComplexI 欠損症で Leigh 脳症の症例だった。その結果、m.14439G>A (MT-ND6) は原因遺伝子変異と同定できたが、m.1356A>G (mitochondrial 12S rRNA) は多型と考えられた。

mtDNA 変異が病因ではなかった 1 例について、さらにエクソーム全周解析を行い核 DNA

の病因遺伝子を検索した。その結果、過去に MRCD の原因遺伝子として報告があり ComplexI の subunit である *NDUFA1* に新規変異 c.55C>T (*NDUFA1*) を認めた。ComplexI の欠損が、*NDUFA1* の変異によるものか確かめるために *NDUFA1* を overexpression させたところ、ComplexI の発現量が増加した。よって c.55C>T (*NDUFA1*) は原因遺伝子変異と考えられた。

【考察】小児MRCDでは特に臨床症状が様々であり、今回の結果でも既知病因変異を認めた症例は少なくmtDNA全周シーケンスの必要があると考えられた。さらに今回新規に同定した欠失3例のうち、2例はCPEO、KSS、Pearson症候群など典型的なmtDNAの欠失を疑う症状がなく、簡便なmtDNAの欠失・重複のスクリーニングは重要である。

今回同定したm.14439G>A はND6proteinの中でも保存された領域にあり、またND6はMRCDの中でもLeigh脳症やMELAS、LHONの原因遺伝子変異のhot spotであった。一方で多型と考えられたm.1356A>G 変異のある*mitochondrial 12S rRNA*はアミノグリコシド難聴や非症候性難聴の原因遺伝子変異のhot spotだが症候性のミトコンドリア病の報告はない。

今回用いたCybrid StudyはmtDNAと核DNA異常の鑑別に非常に良い方法であった。しかし検体の細胞種を選択に限界があり、時間もかかる。我々は、MRCDと生化学的に診断された症例について、系統的にmtDNA全周シーケンスを行い病因として疑わしい変異がmtDNAになれば、併せてエクソーム全周解析を行うことが核変異の同定に有用と考えた。その結果分子生物学的な診断がつくことで、よりの確な遺伝子カウンセリングへ導くことが期待できる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2455 号	氏 名	上原 奈津美
論文題目 Title of Dissertation	ミトコンドリア呼吸鎖異常症における新規MT-ND6 およびNDUFA1 遺伝子変異 New MT-ND6 and NDUFA1 mutations in mitochondrial respiratory chain disorders		
審査委員 Examiner	主 査 戸田 達史 Chief Examiner 副 査 甲村 英二 Vice-examiner 副 査 飯島 一誠 Vice-examiner		

（要旨は1, 0 0 0字～2, 0 0 0字程度）

【目的】

ミトコンドリア呼吸鎖異常症（MRCD）は、いかなる症状、臓器・組織、何歳でもどんな遺伝形式でも起こりうる。特に小児では臨床症状は非特異的で診断が困難である。原因はミトコンドリアDNA（mtDNA）と核DNAの異常の両方ある。しかし同定されている原因遺伝子変異は少ない。我々はMRCDの新規原因遺伝子変異の同定を目的に本研究を行った。

【方法】

今回我々は、臨床症状および皮膚線維芽細胞もしくは罹患臓器を用いたBN-PAGEや呼吸鎖酵素活性の結果、複合体活性の低下で診断した小児MRCD90例を対象とした。患者由来の組織からDNAを抽出し、mtDNAの全周シーケンスを以下の方法で行い変異解析した。mtDNAには核にpseudogeneがあることが知られており、mtDNA(全周16,569bp)を6.5kb, 11.2kbのfragmentとして1st-PCRを行い、その産物を鋳型として2nd-PCRを行い、直接シーケンスを行った。新規のmtDNA変異が病因か鑑別するために、2例でCybrid Studyを用いた。その結果2例中1例はmtDNA変異が病因ではなかったため、エクソーム全周解析を行った。

【結果】

mtDNA全周シーケンス解析の結果、多型のみが61例、多型以外の変異を認めた症例が29例だっ

た。このうち、既知病因変異は13例、新規変異は欠失3例と点変異が13例だった。欠失3例は1st-PCRの電気泳動結果、線維芽細胞および肝臓由来のDNAで、それぞれControlと比べてかなり小さいサイズのbandを認めた。これらの症例に対し直接シーケンス解析で欠失部位の確認を行った。欠失範囲はそれぞれ、3424 bp (nt12493-15916)、6639 bp (nt7734-14372)、5424 bp (nt8574-13997)と同定できた。臨床像は、肝臓障害の強い肝症1例、致命的乳児ミトコンドリア病1例、欠失症例が多く報告されているPearson症候群の1例であった。

同定した新規点変異を認めた13例のうち2例についてcybrid studyを行い、病因がmtDNAか核DNAかを鑑別した。残りの11例は、核DNAが病因と考えられるComplexII欠損症1例、酵素活性の低下部位と変異位置が異なり病因か判定が困難な5例、Cybrid studyで検証困難な線維芽細胞で酵素活性の低下がみられない、もしくは変異率が低い4例でありcybrid studyから除いた。Cybrid studyを行った2例は、m.14439G>A (MT-ND6)とm.1356A>G (mitochondrial 12S rRNA)の変異をもつどちらもComplexI欠損症でLeigh脳症の症例だった。その結果、m.14439G>A (MT-ND6)は原因遺伝子変異と同定できたが、m.1356A>G (mitochondrial 12S rRNA)は多型と考えられた。

mtDNA変異が病因ではなかった1例について、さらにエクソーム全周解析を行い核DNAの病因遺伝子を検索した。その結果、過去にMRCDの原因遺伝子として報告がありComplexIのsubunitであるNDUFA1に新規変異c.55C>T (NDUFA1)を認めた。ComplexIの欠損が、NDUFA1の変異によるものか確かめるためにNDUFA1をoverexpressionさせたところ、ComplexIの発現量が増加した。よってc.55C>T (NDUFA1)は原因遺伝子変異と考えられた。

【考察】小児MRCDでは特に臨床症状が様々であり、今回の結果でも既知病因変異を認めた症例は少なくmtDNA全周シーケンスの必要があると考えられた。

今回同定したm.14439G>AはND6proteinの中でも保存された領域にあり、またND6はMRCDの中でもLeigh脳症やMELAS、LHONの原因遺伝子変異のhot spotであった。一方で多型と考えられたm.1356A>G変異のあるmitochondrial 12S rRNAはアミノグリコシド難聴や非症候性難聴の原因遺伝子変異のhot spotだが症候性のミトコンドリア病の報告はない。

今回用いたCybrid StudyはmtDNAと核DNA異常の鑑別に非常に良い方法であった。我々は、MRCDと生化学的に診断された症例について、系統的にmtDNA全周シーケンスを行い病因として疑わしい変異がmtDNAになれば、併せてエクソーム全周解析を行うことが核変異の同定に有用と考えた。その結果分子生物学的な診断がつくことで、よりの確な遺伝子カウンセリングへ導くことが期待できる。

本研究は、多数のミトコンドリア呼吸鎖異常症を、次世代シーケンサー、サイブリッド解析も駆使して解析し新規の変異を同定した。重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。よって、本研究は、博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める。